

(19) Japanese Patent Office (JP)

(12) Official Gazette for Patents (A)

(11) Patent Application Disclosure No. Tokkai Hei 8 (1996) – 278,303

(43) Kokai (Disclosure) Date: October 22, 1996

		Space for technical disclosure	
(51)	International Cl. ⁶	Identification Codes	Internal File No. FI
	G 01 N	33/48	G 01 N 33/48 S
			C 12 P 19/30
	C 12 P	19/30	
	G 01 N	1/10	G 01 N 1/10 C

Request for Examination:
Requested

Number of Claims: 9 OL

Document: (Total of 12 Pages)

(21) Application No. : Tokugan Patent Application Hei 8 (1996)-78,900

(22) Filing Date: April 1, 1996

(31) Priority right claim no.: 195 12 361.1

(32) Date of priority right: April 1, 1995

(33) Country of priority right claim: Germany (DE)

(71) Applicant: 591005589
Boehringer Mannheim Gesellschaft mit beschränkter
Haftung
116 Zunthoffer Strasse, Mannheim 68305, Federal Republic
of Germany

(74) Agent: Patent attorney: Shuta ASAHINA (and 2 others)

Continued on the last page.

(54) [Title of invention] Method of isolating biological material

(57) [Abstract]

[Object] To present a novel method of isolating biological material.

[Solution procedure] The present invention offers a method of isolating biological material, which is composed of a) a process which presents a biological material that bonds with a porous matrix (C 11) and b) a process characterized by the compression of the aforementioned matrix, under conditions in which the biological material is released from the surface of the aforementioned matrix into the eluate.

[Claims]

[Claim 1] A method of isolating biological material, which is composed of a) a process which presents a biological material that bonds with a porous matrix (C 11) and b) a process characterized by the compression of the aforementioned matrix, under conditions in which the biological material is released from the surface of the aforementioned matrix into the eluate.

[Claim 2] The method presented in claim 1, further characterized in that the biological material contains nucleic acids.

[Claim 3] The method presented in claim 1, further characterized in that matrix (C 11) is compressed by a piston (E), which possesses one or several openings (E 13) that allow the passage of the eluate to the interior of the piston.

[Claim 4] The method presented in claim 1, further characterized in that matrix (C 11) is a part of the structural unit (C) that is located in the eluate container.

[Claim 5] The method presented in claim 4, further characterized in that the matrix (C 11) is pressurized against a part (D 14) of the eluate container (D) that conforms to the shape of the contact surface (E 10) [of the piston].

[Claim 6] The method presented in claim 4, further characterized in that, when said piston (E) exerts pressure on matrix (C 11), the outer contour (E 11) of the piston functions to seal the outer contour in the position of the outer contour of the structural unit (C 12), to prevent the passage of fluid.

[Claim 7] The method presented in claim 3, further characterized in that the interior (E 12) of the piston is essentially tapered in the direction of the opening/openings (E 13) on the contact surface (E 10) of the piston.

[Claim 8] The method presented in claim 1, further characterized in that, when matrix (C 11) is compressed, said matrix (C 11) is compressed in the eluate container, by a piston (E) that can be directly or indirectly mounted to the eluate container, by means of a dovetail [ring and groove] coupling.

[Claim 9] A system for isolating biological material, which is composed of the following component parts: the porous matrix (C 11) that can be compressed in the eluate container (D); and the piston (E) for compressing the aforementioned matrix.

[Detailed explanation of the invention]

[0001]

[Technical field to which the invention belongs] The present invention concerns a method of isolating biological material, by causing it to bond with a solid phase and, furthermore, by releasing the aforementioned biological material, in a special manner; said invention also concerns a system that is well-suited to isolate the aforementioned biological material.

[0002]

[Prior art] Biological materials have increased in importance in various fields, in recent times. This is promoted by the fact that, within the past few decades, it

has now become possible to isolate biological materials from other materials. In general, it is possible to obtain biological material as a complex mixture in combination with other materials. Moreover, most biological materials [that are to be isolated] exist in minute amounts, when compared to the other components of the biological mixture. Changes that can be established relative to the normal condition of the biological material are useful in the diagnosis of anomalous conditions of the biological organism. Thus, the methods used in the analysis of biological materials hold particular significance in the fields of molecular biology and medical care. To some extent, certain special methods of isolation are selected, depending on the analyses that are required. Numerous isolation methods exist for biological materials, depending on the type of biological material that must be isolated and depending on the later use of the material. In the method used for the analysis of antigens and antibodies, the biological material (an antigen, antibody or nucleic acid, for example) bonds with the non-porous interior wall of a cell made of glass or polystyrene. In this case, since the bonding of the biological material is extremely specific, the biological material targeted for detection is immobilized on its surface. This method does not allow the re-release of the biological material and, therefore, it is disadvantageous in continued quantitative measurements.

[0003] In the second type of method, an expandable porous material is used, for example, in order to isolate biological material according to molecular weight. In this method, no bonding exists between the biological material and the

solid phase. The isolation is achieved by using the penetration capacity that is essentially based on different [molecule] sizes and on the nature of different biological materials.

[0004] The third type of isolation method is one in which various biological materials are bonded to porous materials – which possess a component that heightens special characteristics and which manifest a special affinity for the biological material – and in which isolation is achieved, based on the degree of change caused by bonding. This method makes use of a column packing of particle-form affinity material. The liquid that contains the biological material is forced to pass through the packing of this material. Next, the biological material that is to be isolated is bonded to the surface of the porous particles by means of a packing component that possesses an affinity to the biological material. All of the other components of the biological mixture are eluted from the column, with the remaining liquid. At the next step, the biological material [of interest] is released from the porous material, by enabling the eluate to flow, in the same direction through the column, and then by cleaving the bond to the porous material. Thereafter, the biological material is included in the eluate.

[0005] In the methods of the prior art, the eluate is passed through the porous matrix, by pressurizing the direction in which the liquid flows or even by centrifuging the column, to cause the eluate to be discharged from the porous matrix.

However, these methods require the use of a vacuum pump or a centrifuge; accordingly, they require the use of a device that is frequently used in specific medical analyses, for a special purpose. Moreover, the use of such a device – the centrifuge, in particular – shortens the time that is needed, but a continuous processing of the samples cannot be performed.

[0006]

[The object that the invention attempts to solve]The object of the present invention is to present a novel method of isolating biological material, which improves upon the methods set forth in the prior art.

[0007] The principal object of the present invention concerns the presentation of a biological material that bonds with a porous matrix that can be compressed, and it concerns the isolation method of biological materials, by means of the compression of the matrix, under conditions in which the biological material is released from the surface of the matrix into the eluate. An additional object of the present invention concerns a system for the isolation of the biological material.

[0008]

[The procedures to solve the object] Presented here, in accordance with the present invention, are a) the process that presents a biological material that

bonds with the porous matrix (C 11); b) the method of isolating biological materials that is composed of a process in which the biological material is released from the aforementioned matrix surface into the eluate; and a system to isolate the biological materials, which consists of a piston (E) to compress the components and an eluate container (D), a porous matrix (C 11) that can be compressed and the aforementioned matrix.

[0009] The method of isolation that is disclosed by the present invention is one in which 1 or several types of components in the mixture are isolated from the remaining components of this mixture. This particularly concerns a method in which 1 or several types of components, which are to be isolated, form a bond with the solid phase, whereby the remaining liquid is eliminated, and whereby 1 or several types of bound components are subsequently released into a separate liquid.

[0010] Here, biological materials are understood to represent organic compounds that are associated with organisms, such as animals, humans, viruses, bacteria and plants. Components, such as those found in the aforementioned organisms, are examples of these biological materials. The most desirable of these components are those that exist in dissolved form, those that are capable of cell lysis in fluid and those that are capable of bonding with a solid matrix. Examples of these components are not only restricted to low molecular weight materials, such as vitamins (which possess a molecular weight

of less than 2000 D), but they also include active substances in medical treatment, as well as hormones. Moreover, they include, for example, high molecular weight substances (with a molecular weight that exceeds 2000 D), such as biological polymers, which are composed of monomer units. Examples of these include proteins and nucleic acids. The method disclosed in the present invention is particularly well-suited for the isolation of nucleic acids. Substances that are active immunologically, in handling proteins – such as antibodies and antigens – are particularly included.

[0011] The biological material that can be isolated by means of a preferred method is collected from the organism in question, and it is bonded with the matrix. Depending on the part of the organism from which the biological material is to be isolated, a pre-processing procedure can be conducted on the organism. This type of pre-processing is helpful in causing the biological material to be released from the organism. For example, if the organism represents a bacterium or a group of bacteria, this type of pre-processing is necessary. Under such circumstances, it is best to destroy the cell and to release the components of the organism into the liquid. Next, it is possible to isolate solid substances that may be present or can be formed. If the biological material is already present in the liquid, in a form that can be easily used – if it exists in body fluid, for example – cells that may affect the isolation of the biological material or other [interfering] materials are frequently separated. This can be accomplished by means of a filter or by using an affinity material. Under all circumstances, the resultant

product of the pre-processing procedure is always a sample liquid that contains the biological material in a form in which bonding can be accomplished with the matrix.

[0012] In one of the steps of the method disclosed in the present invention, the biological material is presented in a form that is bonded to the porous matrix, which is capable of compression. The matrix disclosed in the present invention represents insoluble materials that take up the fluid that contains the biological material. The chemical composition of the matrix is determined by the fact that the matrix is capable of compression and that it is porous, and for this reason, an organic substance or an inorganic polymer is used. Examples of these include not only plastics, such as polystyrene, but also cellulose materials, such as paper. A substance that contains an optional percentage of glass is an example of an inorganic polymer substance. However, the matrix can also be composed of metal.

[0013] The porous matrix that can be compressed, in the present invention, consists of a structure, composed of the aforementioned material, in which there is an expanded space, which possesses an insoluble compartment and a part that can be filled with fluid. This latter compartment, which is capable of being filled, will hereafter be called the internal packing area. This internal packing area expands in the insoluble part and, as a result, forms a system that

is characterized by adhesive porous and/or empty space. This system is frequently referred to as the pores release system.

[0014] The insoluble part of the system can also form a structure – which is spatially expanded and which possesses an adhesive structure – according to one preferred method. It is possible, but not preferred, for the matrix to be present as a compound system, in which, for example, the particles, at the lower opening of the structure are sealed between a component, which is characterized by the fact that it is oriented in the direction of the interior C 14 and is permeable to liquid, and another component, which is characterized by 2 granular forms, oriented in the direction of the porous-matrix fleece. The granular forms can thereafter take on a slurry function.

In order to release the fluid, the slurry is then compressed, and the 2 components [granular forms] that were added to the different component [permeable to liquid], will reduce the liquid content therein as a result.

[0015] Examples of this type of porous matrix that is capable of being compressed are available in a sponge form, for instance, or as a fleece. According to preferred methods, the matrix is capable of absorbing liquid, and it is possible to coat the surface with the sample specimen.

[0016] In the matrix that can be compressed, as disclosed in the present invention, the internal packing area can be reduced by 50% or more, preferably by 70% or more, and most preferably by 90% or more, by exerting pressure on both the insoluble part and on the structure of the internal packing area that is spatially expanded. The reason for this compression limit is that it is not possible to completely eliminate the internal packing area. Thus, the internal packing of optional area and, therefore, the liquid, will remain in the matrix.

[0017] The preferred range of the ratio of the insoluble material to the internal packing area is 10 : 1 – 1 : 100; the most preferred range is 1 : 1 – 1 : 50.

[0018] It is not necessary that the compression of the porous matrix is reversible. The expansion of the matrix is affected by the amount of the biological material that is to be bonded. The exterior can be freely selected. The selection of the latter is influenced by the type of immobilization of the biological material and the ensuing release. A plate-form matrix is one preferred form.

[0019] The insoluble material of the matrix can be selected, at this point, so that the biological material manifests a strong affinity to this material and, accordingly, so that bonding is promoted. An example of this task is the immobilization of nucleic acids, when fiberglass fleece is used as the insoluble material. It is known that all nucleic acids manifest a certain affinity towards

glass fibers. If the material itself manifests no affinity towards the biological material that is to be isolated, then the surface of this material can be modified so that such bonding can take place. If nucleic acids are to be bound, then it is possible to produce this bonding by the use of a so-called "capture probe" on the surface – that is, to bind a nucleic acid that possesses a sequence that is complementary to the nucleic acid that is to be isolated. If an immunologically active compound is to be isolated – that is, if an antigen or an antibody is to be isolated, then it is possible to immobilize the respective partner of the reaction – that is, it is possible to immobilize either the antibody or the antigen. The bonding of the "capture probe" and/or the immunologically active compound can be achieved by known procedures and used for non-porous materials.

[0020] The biological material can be bound with the porous matrix that is capable of compression by causing the matrix to come into contact with the dissolved solution of the biological material and, furthermore, by incubating it for a sufficient period. Since the amount of the solution in which the biological material exists generally exceeds the internal packing area of the matrix, it is desirable to cause the solution to pass through the matrix, by means of an extraction procedure or by means of centrifugal separation, for example. A particularly desirable procedure is one in which the solution is expelled through the matrix of the container, without subjecting it to low pressure or centrifugal separation. According to a preferred method, the solution that is present in the interior of the matrix that contains the component that is to be bonded is

systematically eliminated from the matrix, by means of procedures, such as extraction, centrifugal separation or pressurizing. If desired, it is possible to irrigate the matrix that contains the biological material in the bonded form; and in this way it is possible to eliminate compounds that attach to it.

[0021] The essential point of the present invention is the method by which the biological material is released from the matrix. Based on the fact that the matrix can be compressed and based on the fact that it is porous, it is possible to obtain the solution of biological material by the compression of the matrix, under conditions in which the biological material is released into the eluate, from the surface of the matrix. Here, compression means a process in which the structures that are mutually and spatially expanded are compressed and in which, as a result, the fluid is pushed out of the internal packing area of the aforementioned structures. While, on the one hand, this increases the ratio of the insoluble material in the entire structure, on the other hand, it also reduces the ratio of the internal packing area that remains. As it is proposed in the present invention, the matrix will be reduced by more than 40%, and most desirably by more than 60%. The amount of compression is also affected by the desired amount of fluid that is contained in the biological material, within other substances. The fluid that is released from the matrix can be obtained and processed by any method that is desired.

[0022] The eluate that is disclosed in the present invention refers to a liquid in which the biological material that is to be isolated can be dissolved. This liquid contains a chemical component by which the equilibrium between the insoluble material and the fluid shifts to the side of the fluid. If the separation that is then performed is to isolate nucleic acids, the liquid that is used as the eluate possesses a salt concentration that is lower than that used to bond the nucleic acid to the insoluble material.

[0023] It is most preferred to perform the method disclosed in the present invention within a system. In order to achieve this, the porous matrix that is capable of compression is introduced into the eluate container, along with the biological material that is bonded with the matrix. It is desirable that the internal form of the porous matrix that is capable of compression is in a part of a container that is adapted to the interior of the eluate container. In order to release the biological material, the eluate is added to the matrix, and compression is effected by means of a piston. Outlets that can be used for the liquid are arranged in the piston, for example, within the container that contains the matrix, or, for example, within the eluate container, or even between their component elements.

[0024] For the material that is used in the design of the container – which will be discussed below – it is desirable that the injection molding procedure is used, and that a polystyrene, for example, particularly a plastic, such as

polypropylene, with an appropriate additive agent, can be used to mold this container.

[0025] Figure 1 shows structure C, which is disclosed as a container, which, in the bottom section, is equipped with a porous matrix that is capable of compression (lengthwise cross-sectional view).

[0026] Figure 2 shows the system of the present invention, in which the matrix is compressed (lengthwise cross-sectional view).

[0027] Figure 3 shows the piston of the present invention, which compresses the matrix and receives the eluate (lengthwise cross-sectional view).

[0028] Figure 4 shows the eluate container D in the present invention, which is advantageous and well-suited for pressurizing the porous matrix that is capable of compression (lengthwise cross-sectional view).

[0029] Figures 5 – 6 show schematic diagrams of the operating steps and structures that are included in the method of the present invention, for isolating the biological material.

[0030] Figures 7 – 8 show cross-sectional views of the sample container and lid, respectively, that are used in the present invention.

[0031] In Figure 7, A 10 represents the inlet opening; A 11 represents the outlet opening; A 17 represents the internal form; A 18 represents an elastic cylinder piece; A 19 represents the external shape; A 20 represents a bar; A 21 represents the holding element; and A 22 represents the positioning element.

[0032] Moreover, in Figure 8, B 10 represents the blocking element; B 11 and B 12 represent the operating elements; B 13 represents the vent passage(s); B 14 represents the filter element; B 16 represents the sealing element; and B 17 represents the cover section.

[0033] The explanation presented hereafter discloses further examples of the objects that are indicated in the illustrations.

[0034] Figure 1 shows a lengthwise cross-sectional view of the structure C, which possesses the shape of a hollow cylinder, with essential upper and lower openings. The porous matrix that is capable of compression, C 11, in the lower section, is fixed in an appropriate position, with a tapered end in the cross section of the cylinder. The matrix is held on the bottom by edge C 19, and it is held in the direction of the top by the circular release bar C 18. When a desired release point is established, along the interior wall C 16 of the structure, this bar can be forced to be separated in the direction of matrix C 11. Structure C possesses the outer form C 12, which is formulated as a hollow unit C 14, and

an internal area. Moreover, this structure is equipped with a flange C 17, which can affix piston E within the structure. By this flange, it is desirable to attach the piston so that it is fixed in a position to compress matrix C 11. In addition, it is desirable that said structure C possesses the edging C 15, to attach the lid on top of the upper opening. Furthermore, it is also possible for it to possess rim C 13, to attach the structure within eluate container D.

[0035] Figure 2 shows a particularly preferred system that characterizes this invention. This system is composed of the following elements – that is, it is composed of eluate container D, structure C, piston E and lid B. Lid B is designed so that it can cover all of the other containers. Figure 2 shows a system in which the eluate, which is essentially contained in the matrix, is forced outside the aforementioned matrix, into the interior of piston E 12.

[0036] Figure 3 shows piston E, which is particularly preferred for the compression of the porous matrix. This piston is uniquely characterized by the sealant ring E 15 of the lower section, which seals the space between structure C and eluate container D; this functions to prevent the seepage of all liquids into the capillary spaces that are formed in this way. If piston E is introduced into the groove of the flange C 17 of structure C, then piston E, which possesses a ring, irreversibly affixes the piston to the top of the structure. Piston E, which is affixed in this way, functions to apply sufficient pressure on the matrix to force the liquid outside the aforementioned matrix.

[0037] The pressure that is exerted on the matrix can be adjusted within a specific range, depending on the length of the ring and groove connection of piston E and depending on the position of the groove of structure C. The shape of the lower part of piston E shows the pressure piston that is suited to the definitive performance of applying the appropriate compression onto the matrix, by the contact surface E 10, which corresponds to that form. The piston shape is created so that dead space is minimized. The concave area E 17 functions for the uptake of release bar C 18.

[0038] A cylindrical opening that passes through the lower part of the piston is arranged in the lower area of the piston, for receiving and collecting the fluid that is forced out of the matrix. The aforementioned opening receives the fluid containing nucleic acids, which is forced out, and it possesses a relatively small diameter and height, which are well-suited for withdrawing the fluid by means of a pipette. Figure 3 shows the relatively constricted form of the internal collecting area by which the piston can be produced for opening E 18. One side of opening E 18 terminates at opening E 13 on the contact surface, and the other side terminates at the internal section E 12 of the piston.

[0039] The upper area of the piston also functions as an opening that is instrumental as a receptacle for the biological material that is obtained. In comparison to the lower section, it possesses a relatively large diameter and an

appropriate height. The diameter and height are selected so that they are respectively appropriate for inserting a pipette into the internal section E 12 and for withdrawing the fluid that is contained inside, through opening E 18.

[0040] Figure 4 shows a lengthwise cross-sectional view of the preferred eluate container. This possesses an inlet opening D 10, for introducing fluid and/or other functional units into the eluate container. Moreover, it possesses an internal edge D 11, for attaching lid B. A groove D 12 can also be arranged in the upper part of the eluate container. The aforementioned groove is instrumental in positioning the structure [C] by means of rim C 13. Another preferred characteristic is a rim D 13 for attaching the eluate container to a plate, which possesses openings with an appropriate diameter. A particularly desirable characteristic is represented by the contact surface D 14, in the lower section of the eluate container.

By forcing this surface to connect with the lower part of structure [C], it is possible to reduce the dead space inside the container. This promotes a particularly effective collection of the biological material.

[0041] In the specific operating form of the method disclosed in the present invention, in which the sample specimen containing nucleic acids is processed, the following operating steps are performed (see Figures 5 – 6). In step 1 (I), the sample specimen solution containing the cells is incubated in a

specimen container A, containing the material to which the cells are bonded in order to obtain nucleic acids. In order to achieve this, it is possible for the aforementioned material to manifest some special bonding characteristics, by affixing antibodies or absorbent material (A 16, not indicated in figure) onto it, for example. However, if fluid passes through the material, it is possible to employ a material (A 15, not indicated in figure) that possesses filtering qualities that leave the cells behind, when, for example, the fluid is eliminated from the sample specimen container. Among the individuals who are occupied in this field, some have described the conditions for affixing cells onto the surface, for example, in "Biomembranes / Part R Transport Theory; Cell and Model Membranes," in volume 171 of *Methods in Enzymology*, which is edited by Sidney Fleischer and [Re]becca Fleischer of the Molecular Biology Department of Vanderbilt University, Nashville, Tennessee.

[0042] In an effort to definitively provide positive and negative protection against contamination of the lid (B), during incubation, it is preferable to close the sample specimen container.

[0043] In a separate step, the fluid is eliminated from the sample specimen container; however, the cells from which the nucleic acids are to be isolated will remain in the container in which said cells are bonded with the material. If the material that binds with the cells is a particulate material, the cells can be retained at a step in which the material is electromagnetic and in which a

magnetic field is applied to the sample specimen container from the outside. The aforementioned magnetic field must be strong enough to retain the particle material in the sample specimen container, when the fluid is removed. The fluid can be removed by means of different methods. For example, it is possible to eliminate the fluid through the inlet opening A 10, or through the outlet opening A 11, which are spatially separated. If the aforementioned outlet opening is positioned in the lower part of the sample specimen container and if it is below the remaining cells, then it is possible to use a low vacuum, for example, to aspirate the fluid. In order to accomplish this, it is possible to install a bulb that introduces a low pressure at the outlet opening.

[0044] In order to eliminate the other components of the sample specimen that can cause blockage, from the cells, it is also possible to perform a single or several irrigation steps. To perform this, irrigation fluid is introduced into and fills the sample specimen container. The aforementioned irrigation fluid essentially does not affect the bonding of the cells onto the surface of the cell-bonding material, but it dissolves the contaminants as much as possible. This type of irrigation fluid is known to persons skilled in the art, with the use of techniques such as the cell isolation protocol for nucleic acids, for example, or by employing a reactive irrigation kit protocol. These techniques are fundamentally dependent on how the cells bond to the material.

[0045] After the final irrigation fluid is removed from sample specimen container A, the purified and concentrated cells are forced to contact an appropriate lysing fluid, in order to release the nucleic acids from the cells. This lysing fluid reagent is greatly dependent on the type of cells that are immobilized. If the cells are bacteria, the lysing solution should preferably contain proteinase K, which functions to digest the cell walls. It is possible to promote the lysing process by heating or cooling and by agitating the reaction substance. If electromagnetic particles are used as a material to bond the cells, then it is possible to achieve cell lysis by means of a magnet. Moreover, it is possible to mix the solution by shaking the specimen sample container. Once cell lysis is completed, the nucleic acids that are to be isolated can be freely obtained, in the form of a solution.

[0046] Also during cell lysis, the reaction container should be closed with a lid, in order to prevent contamination from the surroundings. Following the completion of the cell lysis, a mechanical device should preferably be used to remove the lid. Next, structure C, in which the outer shape C 12 corresponds to the inner shape A 17 of the sample specimen container, is introduced into the sample specimen container, which contains a mixture of the digested cells and the nucleic acids. This structure is sealed in the hollow inside, by a porous matrix, for the sample specimen container and for the reaction mixture solution. The closing of the sample specimen container can be accomplished in a desirable manner, if structure C is introduced by means of structural element B

11 of lid B, which also contains the appropriate structural element B 10. In this case, the lid is left on, as the structure [C] is picked up by the lid (II), and it is introduced into the sample specimen container. Throughout this procedure, the reaction mixture can enter the hollow space C 14 of structure C by passing through porous matrix C 11 (IV). Due to the installation of the porous matrix, it is possible to prevent the entry of large particles into the hollow space. If the porous matrix already possesses a property for bonding nucleic acids, then the nucleic acids can bond with the porous matrix during the passage of the reaction mixture. In such a case, it is most preferable to select a matrix material that contains fiberglass.

[0047] In the next step, the remaining cell lysis reactive mixture is eliminated from the device that is made up of A and C, by aspirating the solution from the sample specimen container through the outlet opening A 11, which is positioned at the bottom of the container, for example. As a result, the solution that had been contained in the hollow space C 14 of the structure is removed, and the filter now contains almost no liquid. Next, while structure C is still left remaining in the sample specimen container (it is connected by groove and rim in the specified position), lid B, which was used previously, is removed (V).

[0048] At the same time or in the next step, the eluate container D is employed, to receive structure C. If necessary, the lid that can be installed on this container is removed (VI). Preferably, before structure C is moved into

eluate container D, a pipette, for example, is used to introduce a separating fluid into the eluate container. The composition of the separating fluid is affected by the nucleic acids bound with the material in the porous matrix of structure C.

This separating fluid causes the immobilized nucleic acids to be separated from the material; that is, it contains a reagent that causes the nucleic acids to be released from the material. At this point, the lid B, which was originally used to close the sample specimen container A, is placed on the eluate container, together with structure C (VII).

[0049] In order to withdraw structure C to a position outside sample specimen container A, the lid is removed first. Next, the connected body of the lid and structure C are introduced into the eluate container. According to a preferred method, structure C has the rim C 13 K*, in order to appropriately affix the structure in eluate container D. Due to the aforementioned rim, structure C or container D must be destroyed to remove the aforementioned structure, or a force that exceeds such power necessary to remove lid B from structure C must be used. The present invention does not propose the removal of the structure from the eluate container.

[0050] When structure C enters into the eluate container, in which the separating fluid is already contained, the fluid enters into porous matrix C 11 and

* sic; C13?—Trans. note.

the nucleic acids affixed to the solid matrix are released. Depending on the amount of separating fluid that is present, either the porous matrix alone is forced to absorb the separating fluid or the separating fluid enters into the hollow space C 14, together with the nucleic acids that are released. In order to complete the separation of the nucleic acids, the inner form of the eluate container should be pushed against the outer form [C] of the structure, so that it is strongly energized as much as possible.

[0051] In the next step, lid B is removed from the connected unit consisting of structure C and eluate container D (X). The aforementioned lid B is used to pick up the piston E (XI), and furthermore, the aforementioned piston E is introduced into the hollow unit of structure C (XII). Then the aforementioned lid is attached, on the inside, to piston E. The piston is pushed against porous matrix C 11, so that the fluid that is present in the porous matrix passes through the opening that is positioned at the contact surface to the interior of the piston. This procedure is particularly effective, when the outer shape of the contact surface corresponds, at least, to the inside shape of structure C, within the area in which the aforementioned piston stroke can be accomplished. For example, it is preferable to affix piston E in this position, by placing a ring and groove connection in the correct position. Since the device that is formed in this way is relatively well-sealed by the lid, it is possible to store the fluid – containing the nucleic acids – within this device.

[0052] In order to withdraw the desired amount of the fluid containing nucleic acids, the lid can be removed (XIII); furthermore, it is possible to remove the desired amount of fluid, through the opening in the interior of the piston (XIV). Next, the lid can be replaced in the correct position.

[0053]

[Performance of the invention] The following procedure should be preferably followed for the method described in the present invention:

- a) Bonding the biological material to matrix C 11, which can be compressed.
- b) Adding separating fluid to eluate container D.
- c) Introducing the porous matrix C 11 that is capable of compression into structure C.
- d) Introducing piston E into structure C and both of these into eluate container D; the aforementioned piston possesses a contact surface that is well-suited for the compression of the matrix; and the piston possesses an interior space E 12, which receives the fluid that is expelled from the matrix; and
- e) By connecting the piston to the structure, the matrix functions to maintain the compression. The order of processes b and c can be switched, as desired, at this point. The separation fluid, which is included with the biological material [of interest] that is contained inside the device, can be stored by means of this system (the use of a closed lid is preferable). Moreover, the fluid [containing the biological material of interest] can alternatively be removed by means of a pipette, and it can be processed according to any method that is desired.

[0054] The method disclosed in the present invention is particularly well-suited for the composition of fluids containing biological material at a relatively high concentration. In the present invention, nucleic acids are caused to be released from the matrix, while the occurrence of bubbling is reduced. Moreover, the operating steps proposed by the present invention greatly promote the method of isolating biological material.

[0055] An additional object of the present invention is to disclose a system for the isolation of biological material, which is composed of the following structural elements: the eluate container D; the porous matrix that is capable of compression; and the piston E for the compression of the matrix.

[0056] Further desirable characteristics are disclosed in the method in the present invention. The following working examples function to explain the present invention in further detail. However, the working examples of the present invention are not limited to those described below.

[0057] Working Example 1

The preferred actual form of the piston is a plastic cylinder E, with a hollow cylindrical form, which possesses a different diameter in its interior (D [bottom section] = 1 mm; F [top section] = 5 mm).

[0058] The piston can be characterized by the following measurements.

[0059] Length: 38.6 mm
Outer diameter: 5.8 mm
Inner diameter: 5.0 mm

The lower part of the piston possesses a central hole or a central opening E 13.

The top part is the receptacle E 12, which opens towards the top.

[0060] In this top part, the outer surface E possesses the ring E 16, which contacts and positions the structure C. The circular ring is positioned 3.5 mm below the upper edge and possesses a depth of 0.3 mm and a height of 0.25 mm. On the bottom, the sealing part E 15 is introduced onto the piston. The aforementioned sealing part is 0.28 mm in height and possesses a width of 0.1 mm.

[0061] The upper opening of the piston possesses an interior shape that connects the functional lid B to eluate container D. Piston E is capable of being introduced into structure C, and it is designed so that the entire system can be closed with lid B.

[0062] Working Example 2

Biological material / drug / device. Sample specimen material:

Longitudinal Standard II, Boehringer Mannheim.

Bonding buffer solution: Qiagen AL 1 / AL 2 (4 parts / 1 part); manufactured by Qiagen.

[0063]

Irrigation buffer solution: Qiagen AW buffer solution; manufactured by Qiagen.

[0064]

Eluate buffer solution: 10 mM Tris buffer solution; pH 9.0.

Sample specimen container A

Sample specimen container lid B

Structure C, which contains the porous matrix C 11 produced from glass fleece.

Eluate container D

Eluate container lid E

Pressure piston F of the structure

[Preparation of the sample specimen solution]

Sample specimen	200 µl (6 µl of longitudinal standard II dissolved in PBS buffer solution)
-----------------	--

Proteinase K	25 µl
--------------	-------

Binding buffer solution	200 µl (AL 1 and AL 2 buffer solutions that have been combined at a ratio of 4 parts: 1 part)
-------------------------	---

Ethanol	210 µl
---------	--------

Total amount	—
Individual batch	635 µl

[Method by which the working examples were performed]

The sample specimen container A was filled with 200 µl of the sample, 25 µl of the proteinase K solution and 200 µl of the bonding buffer solution. The sample specimen container A was closed with the sample specimen container lid B. The fluids were combined within the closed container. Next, the mixture was incubated for 10 minutes at 70° C (digestion of the cells); then, in a cooling phase, the mixture was cooled to 20° C in 3 minutes. The sample specimen container A was opened and 210 µl of ethanol were added to it. Sample specimen container A was closed, and the solution was mixed.

[0065] Sample specimen container A was then opened. Using the sample specimen container lid B, from outside the base material, we picked up structure C, which contained the porous matrix. We introduced the structure with the glass-fleece porous matrix, through the inlet opening, into the sample specimen container filled with fluid. During said introduction, the fluid that was present in sample solution container A passed through the glass fleece, from the bottom part. At this point, the nucleic acids, which moved about freely, bonded with the glass fleece matrix. In the next step, the liquid that was present in structure C was aspirated in the direction of the bottom section. The fluid passed through

the glass fleece for a second time, and at this point, the nucleic acids that had not bonded as yet, were immobilized on top of the matrix.

[0066] The glass-fleece matrix was irrigated twice with 500 μ l of irrigation buffer solution each time. The buffer solution on the matrix was aspirated through the glass fleece. Next, the matrix was dried together with the nucleic acids for 3 minutes at 50° C. Then lid B of the sample specimen container was removed.

[0067] Using a lid E for the eluate container D, we moved structure C, containing the nucleic acids, into the prepared eluate buffer solution in eluate container D, which contained 200 μ l of the eluate buffer solution. The eluate buffer solution released the nucleic acids from the glass fleece. The nucleic acids were partially positioned on top of the matrix.

[0068] Through the introduction of a pressure piston F, by means of the lid E of eluate container D, the matrix within the structure was compressed, so as to minimize the dead space of the nucleic acid solution.

[0069]

[Composition of nucleic acids] A test was conducted by using 2 different nucleic-acid sample concentrations. The measurements presented in the results below were obtained. Table 1 presents the results of a test, which

was conducted by using a sample concentration that contained 6 μg of nucleic acids within an eluate of 200 μl . Table 2 presents the results of a test, which was conducted by using a sample concentration that contained 20 μg of nucleic acids within an eluate of 200 μl .

[0070]

[Table 1]

Table 1

Sample specimen no.	Bonded nucleic acids that are isolated (μg)	Yield (%)
Test 1	1.4	22.9
Test 2	1.6	27.5
Test 3	1.2	23.8
Test 4	1.5	29.8
Test 5	1.6	35.2

[0071]

[Table 2]

Table 2

Sample specimen no.	Bonded nucleic acids that are isolated (μg)	Yield (%)
Test 1	3.7	28.0
Test 2	6.4	38.8
Test 3	4.8	40.0
Test 4	4.1	30.3
Test 5	5.1	37.8

[Brief explanation of the figures]

[Figure 1] This is a lengthwise cross-sectional view of the structure, which is used in the procedure of the present invention, which is formed as a container that possesses, in the bottom section, a porous matrix that is capable of compression.

[Figure 2] This is a lengthwise cross-sectional view of the system of the present invention, in which the matrix is compressed.

[Figure 3] This is a lengthwise cross-sectional view of the piston in the present invention, which functions to compress the matrix and receive the eluate.

[Figure 4] This is a lengthwise cross-sectional view of an eluate container that is well-suited for the process of pressurizing the porous matrix that is capable of compression.

[Figure 5] This is a schematic diagram of the operating steps and structures that are included in the method of the present invention, to isolate biological material.

[Figure 6] This is a schematic diagram of the operating steps and structures that are included in the method of the present invention, to isolate biological material.

[Figure 7] This is a cross-sectional view of the sample container that is used in the procedure of the present invention.

[Figure 8] This is a cross-sectional view of the lid that is used in the procedure of the present invention.

[Explanation of key symbols]

- A Sample specimen container
- B Lid
- C Structure
- 11 Porous matrix
- 12 Outer form
- D Container
- E Piston
- 10 Contact surface
- 11 Outer form
- 12 Interior
- 13 Opening

[Figure 3]

E 14

E 16

E 12 Interior

E 11 Outer form

E Piston

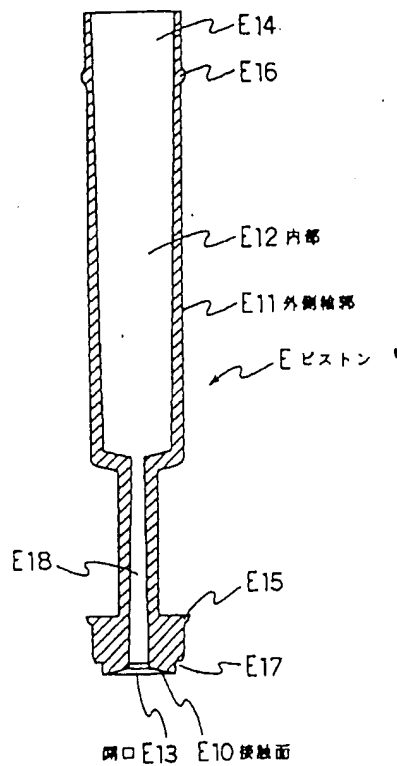
E 18

E 15

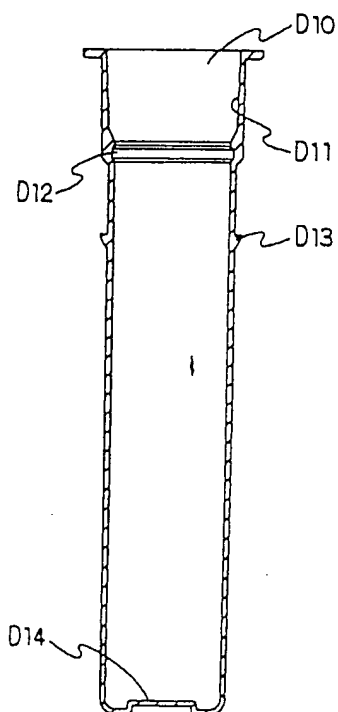
E 17

E 13 Opening

E 10 Contact surface

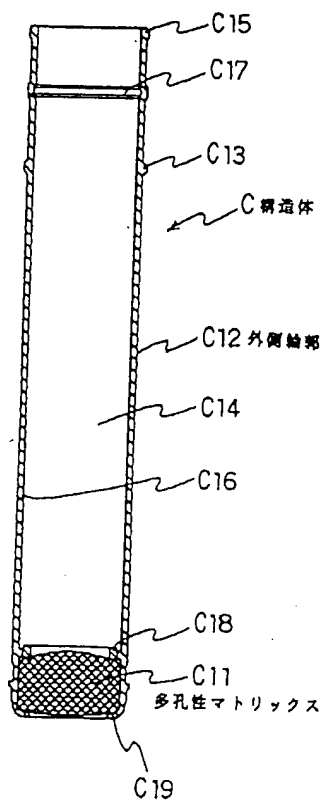


[Figure 4]



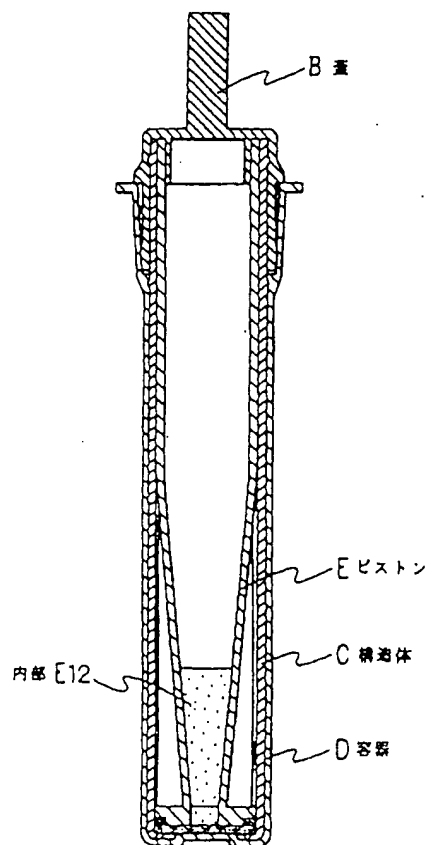
[Figure 1]

- C 15
- C 17
- C 13
- C Structure
- C 12 Outer form
- C 14
- C 16
- C 18
- C 11 Porous matrix
- C 19



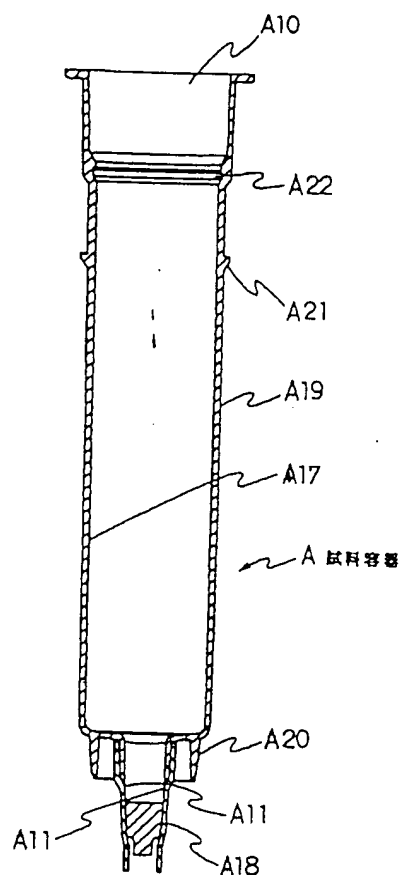
[Figure 2]

- B Lid
- E Piston
- C Structure
- E 12 Interior
- D Container



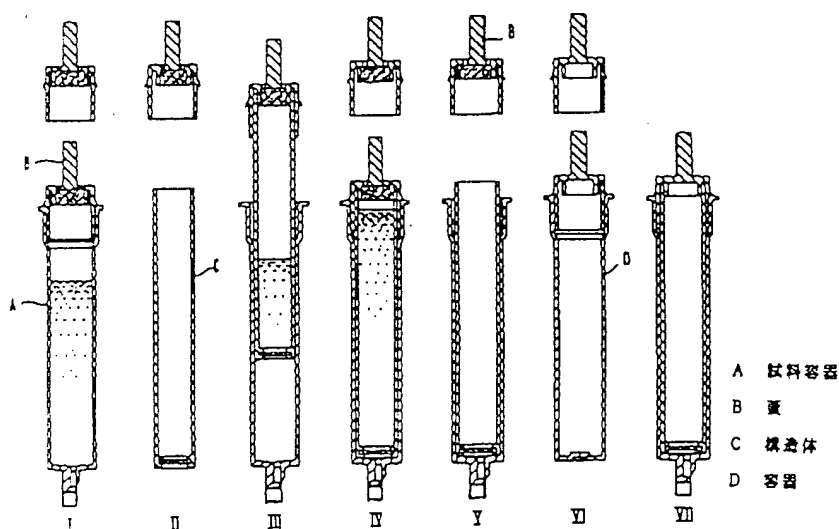
[Figure 7]

- A 10
 A 22
 A 21
 A 19
 A 17
 A Sample specimen container
 A 20
 A 11
 A 11
 A 18



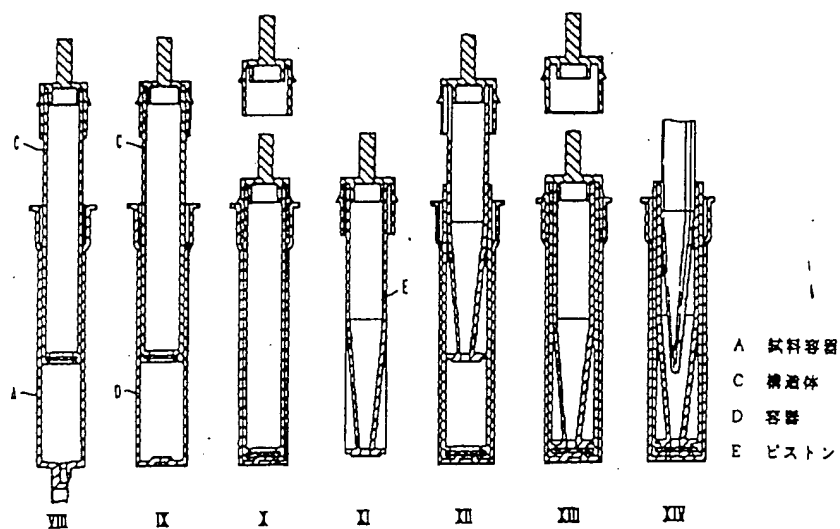
[Figure 5]

- A Sample specimen container
 B Lid
 C Structure
 D Container



[Figure 6]

- A Sample specimen container
 C Structure
 D Container
 E Piston



[Procedural revisions]

[Date of submission] April 2, 1996

[Procedural revision 1]

[Document title of targeted revision] Specification

[Item title of targeted revision] Scope of Patent Claim

[Method of revision] Modification

[Details of revision]

[Scope of Patent Claims]

[Claim 1]

A method of isolating biological material, which is composed of a) a process which presents a biological material that bonds with a porous matrix (C 11) and b) a process characterized by the compression of the aforementioned matrix, under conditions in which the biological material is released from the surface of the aforementioned matrix into the eluate.

[Claim 2] The method presented in claim 1, further characterized in that matrix (C 11) is compressed by a piston (E), which possesses 1 or several openings (E 13) on the contact surface, which force the eluate to pass through into the interior of the piston.

[Claim 3] The method presented in claim 1, further characterized in that, when matrix (C 11) is compressed, it is compressed in the eluate container by means of the piston (E), which can be installed directly or indirectly into the eluate container (D), by means of a ring and groove connection.

[Claim 4] A system that isolates biological material, which is composed of the following components; the eluate container (D), the porous matrix (C 11) that is capable of compression, and the piston (E), which is capable of compressing the aforementioned matrix.

Continued from front page:

[Transliteration of German names and addresses are phonetic; actual spelling may differ.—Translator's note]

- (72) Inventor: Gerhardt BEINHAUS
 1 Kavendale Strasse, Veilenbach, D – 82407, Federal
 Republic of Germany
- (72) Inventor: Michael FRITZ
 19 Gross – Rolleheimer Strasse, Beibris, D – 68647, Federal
 Republic of Germany
- (72) Inventor: Schvap JURGEN
 37 Endale Strasse, Ketch, D – 68775, Federal Republic of
 Germany
- (72) Inventor: Edda GEISLER
 141 Mannheim Freidrich Strasse, Veilenbach, D – 68199,
 Federal Republic of Germany

- (72) Inventor: Herbert HARTICH
11 Foiellebach Strasse, Altrip, D – 67122, Federal Republic
of Germany
- (72) Inventor: Heinz MAHO
42 Oltz Strasse, Hultz, D – 64658, Federal Republic of
Germany

Ref. 1

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-278303

(43) 公開日 平成8年(1996)10月22日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/48			G 0 1 N 33/48	S
C 1 2 P 19/30			C 1 2 P 19/30	
G 0 1 N 1/10			G 0 1 N 1/10	C

審査請求 有 請求項の数 9 O L (全 12 頁)

(21) 出願番号	特願平8-78900	(71) 出願人	591005589
(22) 出願日	平成8年(1996)4月1日		ベーリンガー・マンハイム・ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンクテル・ハフツング
(31) 優先権主張番号	1 9 5 1 2 3 6 1 . 1		BOEHRINGER MANNHEIM
(32) 優先日	1995年4月1日		GESELLSCHAFT MIT B
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		ESCHRANKTER HAFTUNG
			ドイツ連邦共和国、68305 マンハイム、ザントホーファー シュトラッセ 116
		(74) 代理人	弁理士 朝日奈 宗太 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 バイオロジカル・マテリアルを単離する方法

(57) 【要約】

【課題】 バイオロジカル・マテリアルを単離するための新規な方法を提供すること。

【解決手段】 本発明は、a) 多孔性マトリックス (C 1 1) に結合するバイオロジカル・マテリアルを提供する工程、およびb) バイオロジカル・マテリアルを前記マトリックスの表面から溶離液に放出させる条件下で前記マトリックスを圧縮する工程からなるバイオロジカル・マテリアルを単離する方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 a) 多孔性マトリックス (C 1 1) に結合するバイオロジカル・マテリアルを提供する工程、および

b) バイオロジカル・マテリアルを前記マトリックスの表面から溶離液に放出させる条件下で前記マトリックスを圧縮する工程からなるバイオロジカル・マテリアルを単離する方法。

【請求項 2】 バイオロジカル・マテリアルが核酸を含有することを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】 マトリックス (C 1 1) が、溶離液をピストンの内部に通過させるための 1 ないし数個の開口 (E 1 3) を接触面に有するピストン (E) により、圧縮されることを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】 マトリックス (C 1 1) が溶離容器 (D) に位置する構造体 (C) の一部分であることを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】 マトリックス (C 1 1) が、接触面 (E 1 0) の形態に合致する溶離容器 (D) の一部分 (D 1 4) に対して、加圧されることを特徴とする請求項 4 記載の方法。

【請求項 6】 ピストン (E) がマトリックス (C 1 1) に圧力をかけたとき、ピストンの外側輪郭 (E 1 1) が構造体の外側輪郭 (C 1 2) に対して、液体を通さないようにその位置の外側輪郭をシールすることを特徴とする請求項 4 記載の方法。

【請求項 7】 ピストンの内部 (E 1 2) が本質的にピストンの接触面 (E 1 0) における開口 (E 1 3) に向かって先細になることを特徴とする請求項 3 記載の方法。

【請求項 8】 マトリックス (C 1 1) が圧縮されるとき、直接または間接的に嵌入連結で溶離容器 (D) に取り付けうるピストン (E) により、マトリックス (C 1 1) を溶離容器の中で圧縮することを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 9】 以下の構成部分、溶離容器 (D) 圧縮可能な多孔性マトリックス (C 1 1) および前記マトリックスを圧縮するためのピストン (E) からなるバイオロジカル・マテリアルを単離するためのシステム。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、バイオロジカル・マテリアルを固相に結合させ、さらに特別な手順で前記バイオロジカル・マテリアルを放出する (release) ことにより前記バイオロジカル・マテリアルを単離する方法、および前記バイオロジカル・マテリアルを単離するのに適したシステムに関する。

【0002】

【従来の技術】最近、バイオロジカル・マテリアルは多くの分野で重要性が増加してきている。これは、ここ数十年のあいだでほかのマテリアルからバイオロジカル・

マテリアルを分離することが可能になってきたという事実によって促進される。一般に、バイオロジカル・マテリアルはほかのマテリアルをともなった複雑な混合物として入手可能である。さらにまた、ほとんどのバイオロジカル・マテリアルは、生物学的個体のほかの成分と比べ非常に微量で存在する。バイオロジカル・マテリアルの正常な状態に対する変化は、生物学的個体の状態を診断するのに役立つ。それゆえに、バイオロジカル・マテリアルを分析する方法には、分子生物学および医療の分野で特別な重要性がある。必要とされる分析によって、多少特異的な単離の方法が選択される。単離されるべきバイオロジカル・マテリアルのタイプおよびそののちの用途によりバイオロジカル・マテリアルのための多数の単離方法が存在する。抗原類および抗体類の分析に使用される方法では、バイオロジカル・マテリアル (たとえば、抗原、抗体または核酸) は、ガラスまたはポリスチレンで作られたキュベットの非多孔性内壁に結合する。このばあい、バイオロジカル・マテリアルの結合は、非常に特異的であるので、検出されるべきバイオロジカル・マテリアルはその表面に固定化される。この方法は、バイオロジカル・マテリアルを再度放出することは提案しておらず、これは、続く定量測定に不利でさえある。

【0003】2番目のタイプの方法では、バイオロジカル・マテリアルをたとえばそれらの分子量によって分離するために、膨張可能で多孔性の材料を使用する。この方法では、バイオロジカル・マテリアルと固相とのあいだに結合はない。分離は、本質的にはそれらの異なるサイズにもとづく、バイオロジカル・マテリアルの異なる貫通特性を使用して達成される。

【0004】3番目の種類の単離方法は、特異性を高める基がついている、バイオロジカル・マテリアルに対して特別のアフィニティーを示す多孔性材料に、異なるバイオロジカル・マテリアルを結合させ変化の程度にもとづき単離する方法である。この方法は、粒子型のアフィニティー材料のカラム状堆積物を利用する。この材料の堆積物にバイオロジカル・マテリアルを含有する液体を通させる。ついで、単離されるべきバイオロジカル・マテリアルは、バイオロジカル・マテリアルに対してアフィニティーを有する基で多孔性粒子の表面に結合される。全てのほかの成分が残りの液体とともにカラムから溶離する。続く段階で、正確に同じ方向でカラムを通して溶離物が流れることを可能にし、ついで多孔性材料への結合を切ることによってバイオロジカル・マテリアルは多孔性材料から放出される。そののち、バイオロジカル・マテリアルは溶離液中に含有される。

【0005】現在までに知られている方法では、その液体の流れる方向に圧力をかけることによるか、または多孔性マトリックスの外に溶離液を吐き出させるためにカラムを遠心することによってさえ、溶離液は多孔性マト

リックスを通過した。しかし、この方法は、真空ポンプまたは遠心分離の使用を要し、したがって特定の目的のための医療の決まった診断にしばしば使用される器械の使用を要する。さらに、これらの器械、とくに遠心分離機の使用は時間を短縮するが、試料の連続処理ができない。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、従来技術で知られているものより改善をもたらすバイオロジカル・マテリアルを単離するための新規な方法を提供することである。

【0007】本発明の主題は、圧縮可能な多孔性マトリックスに結合したバイオロジカル・マテリアルを提供し、バイオロジカル・マテリアルがマトリックスの表面から溶離液中に放出される条件下でマトリックスを圧縮することによってバイオロジカル・マテリアルを単離する方法にある。本発明の別の主題は、バイオロジカル・マテリアルを単離するためのシステムにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明にしたがい、a) 多孔性マトリックス (C 1 1) に結合するバイオロジカル・マテリアルを提供する工程、および

b) バイオロジカル・マテリアルを前記マトリックスの表面から溶離液に放出させる条件下で前記マトリックスを圧縮する工程からなるバイオロジカル・マテリアルを単離する方法、ならびに以下の構成部分、溶離容器

(D) 圧縮可能な多孔性マトリックス (C 1 1) および前記マトリックスを圧縮するためのピストン (E) からなるバイオロジカル・マテリアルを単離するためのシステムが提供される。

【0009】本発明で理解される単離方法は、混合物中の 1 または数種の成分をこの混合物の残りの成分から分離する方法である。これは、分離されるべき 1 または数種の成分が固相に結合し、残りの液体を除去し、続いて 1 または数種の結合成分を別の液体中に放出させるような方法をとくに包含している。

【0010】バイオロジカル・マテリアルは、たとえば動物、ヒト、ウイルス、細菌、または植物などの生物に関係する有機化合物であると理解される。それらとしては、たとえば、前記の生物にみられる成分があげられる。とくに好ましい成分は、溶解した形態で存在するかまたは液体中に溶解しうが、固形マトリックスと結合もしうるものである。それらとしては、1 つには、ビタミン類のような (2000D 未満の分子量をもつ) 低分子物質のみならず、治療的に活性な物質およびホルモン類があげられる。さらに、それらとしては、たとえばモノマー単位からなる生体ポリマー類などの (2000D より大きい分子量をもつ) 高分子物質もあげられる。それらとしては、たとえば、タンパク質および核酸があげられる。本発明による方法は、とくに核酸を単離するの

に適している。タンパク質を扱う際、たとえば抗体類および抗原類などの免疫学的に活性な物質がとくに好まれる。

【0011】好ましい方法で単離されうるバイオロジカル・マテリアルを、問題の生物の液体から回収し、マトリックスに結合させる。バイオロジカル・マテリアルがそれから単離されるべき生物の部分によって、生物に前処理を行なってもよい。このような前処理は、生物からバイオロジカル・マテリアルを放出させるのに役立つ。たとえば、生物が細菌またはバクテリアの群であるばあい、このような前処理が必要である。このばあいに、細胞を破壊して生物の成分を液体中に放出させるのが好ましい。つぎに、形成されている可能性がある固形物質を分離しうる。バイオロジカル・マテリアルがすでに利用しやすい形態で液体に存在するばあい、たとえば体液に存在するばあいは、バイオロジカル・マテリアルの単離に影響するかもしれない細胞またはほかの物質がしばしば分離される。これは、濾過によって、またはアフィニティー材料を使用することによって達成しうる。どのようなばあいにも、前処理の結果物は、つねに、マトリックスに結合しうる形態でバイオロジカル・マテリアルを含有する試料液である。

【0012】本発明の方法の 1 つの段階では、バイオロジカル・マテリアルは、圧縮可能な多孔性マトリックスに結合した形態で提供される。本発明で理解されるマトリックスは、バイオロジカル・マテリアルを含有する液体中に存在する不溶性の材料である。マトリックスの化学的組成は、マトリックスが圧縮可能で多孔性であるべきであるという事実によって決定され、その理由のため有機または無機ポリマー類が使用される。有機ポリマー類としては、たとえば、ポリスチレンのようなプラスチック類のみならず、たとえば紙のようなセルロースもあげられる。無機ポリマー類としては、とくに、任意の比率のガラスを含有する物質があげられる。しかし、マトリックスは金属からなりうる。

【0013】本発明による圧縮可能な多孔性マトリックスは、前記の材料から作られた不溶性部分および液体で充填されうる部分を有する空間的に拡張した構造である。この充填可能な部分を、以下、内容積という。内容積は、不溶性部分のあいだに広がり、その結果密着性の多孔性および／またはからの空間という系を形成する。この系を好ましくは開放多孔性系ともいう。

【0014】系中の不溶性部分は、好ましい方法で、密着性の構造をもつ空間的に拡張した構造をも形成する。マトリックスが複合成分系、たとえば、粒子型の成分が構造体の下部開口で、内部 C 1 4 に向かう方向と、液体透過性の成分、たとえばフリースの方向で 2 粒子型の成分のあいだに封じられている系であることは可能であるが、好ましくはない。粒子型の成分は、そののち 2 成分のあいだでスラリー (slurry) の機能を帯びう

る。液体をえるために、そののちスラリーの圧縮に導き、そのなかに含有された液量を結果的に減少させる 1 つの別の成分に 2 成分を加える。

【0015】このような圧縮可能な多孔性マトリックスについての例は、スポンジ型の構造およびたとえばフリースなどの繊維類からなる構造である。好ましい方法では、マトリックスは液体を吸収することができ、試料をその表面に塗布することも可能である。

【0016】本発明で理解される圧縮可能なマトリックスは、不溶性部分および内容積の空間的に拡張された構造とともに圧力をかけることにより、内容積を 50 % またはそれより多く、好ましくは 70 % またはそれより多く、とくに好ましくは 90 % またはそれより多く減少させるものである。実際の理由として、内容積を完全に除去することは、達成しうる見込みはない。そのため、任意の比率の内容積およびしたがって液体は、マトリックス中に残る。

【0017】内容積に対する不溶性材料の容積率は、好ましくは 10 : 1 ~ 1 : 100 の範囲、とくに好ましくは 1 : 1 ~ 1 : 50 の範囲にある。

【0018】多孔性マトリックスの圧縮可能性は、必ずしも可逆的である必要はない。すなわち、マトリックス上にかけられた圧力を開放するとき、マトリックスは必ずしもその元の形にもどる必要はない。マトリックスの拡張はなかでも結合すべきバイオロジカル・マテリアルの量に左右される。外形は、自由に選択しうる。なかでもバイオロジカル・マテリアルの固定化のタイプおよびそれに続く放出に左右される。プレート形状のマトリックスが好ましい。

【0019】バイオロジカル・マテリアルがこの材料に対して高いアフィニティーを示し、したがって、結合を促進するようにマトリックスの不溶性材料がすでに選ばれうる。ガラス繊維製フリースを不溶性材料として使用するときの核酸の固定化がこのようなかである。すべての核酸がガラス繊維に対し、あるアフィニティーを示すことが知られている。材料自体が単離されるべきバイオロジカル・マテリアルに対していかなるアフィニティーをも示さないばあい、この材料の表面は結合できるように修飾されうる。核酸を結合させるべきであるばあい、表面に対していわゆる捕獲プローブ、すなわち、単離されるべき核酸に相補的である配列を有する核酸を結合させることが可能である。免疫学的に活性な化合物が単離されるべきばあい、すなわち抗原類または抗体類が単離されるべきばあい、対応する免疫相手、すなわち、抗体類または抗原類を固定化することが可能である。捕獲プローブおよび／または免疫活性化合物の結合は、非多孔性材料のために知られてもいる方法により成しうる。

【0020】圧縮可能な多孔性マトリックスに結合したバイオロジカル・マテリアルは、マトリックスをバイオ

ロジカル・マテリアルの溶液と接触させ、さらに充分な時間インキュベートすることで成しうる。バイオロジカル・マテリアルが存在する溶液の量が通常マトリックスの内容積を超えるので、たとえば吸引 (drawing off) かまたは遠心分離によって、溶液にマトリックスを通過させることが好ましい。とくに好ましい方法では、低い圧力かまたは遠心分離に付すことなしに溶液が容器中のマトリックスを通して押し出される。好ましい方法では、結合されるべき溶液の成分を含有するマトリックスの内部に存在する液体は、たとえば吸引、遠心分離することまたは加圧することによっても、つづいてマトリックスから除去される。所望すれば、結合した形態でバイオロジカル・マテリアルをちょうど含有するマトリックスを洗浄してもよく、それに付着しうる混入物が除去されうる。

【0021】本発明の中核は、バイオロジカル・マテリアルがマトリックスから放出される方法である。マトリックスが圧縮可能で多孔性である事実により、単離されたバイオロジカル・マテリアルの溶液は、バイオロジカル・マテリアルがマトリックス表面から溶離液中に放出される条件下でマトリックスを圧縮することによってえられうる。圧縮は、空間的に拡張された構造同志を圧縮し、それによって前記構造の内容積の外に液体を押し出すことを意味する。これが全構造中の不溶性の材料の比率を増大させる一方、残りの内容積の比率を減少させる。本発明によって提案されるとおり、マトリックスは 40 % より多く、とくに好ましくは 60 % より多く減少する。圧縮の拡張は、ほかのもののなかで、バイオロジカル・マテリアルを含有する液体の所望の量にも左右される。マトリックスから出る液体は、いかなる所望の方法によってもえられ、さらに処理され (process) うる。

【0022】本発明で理解される溶離液は、単離されるべきバイオロジカル・マテリアルが溶解しうる液体である。その液体は、不溶性材料と溶液との平衡が溶液の側に移行するような化学的組成物を有している。核酸がそののち単離するものであるばあい、溶離液として使用される溶液は、核酸を不溶性材料に結合させるのに使用した溶液より低い塩濃度を有するものである。

【0023】本発明の方法はシステム内で行なうのが好ましい。これを達成するために、圧縮可能な多孔性マトリックスをそれに結合したバイオロジカル・マテリアルとともに溶離容器内に導入する。圧縮可能な多孔性マトリックスはその内部形態が溶離容器の内部と合致する容器の部分であることが好ましい。バイオロジカル・マテリアルを放出するために、溶離液をマトリックスに加え、さらにピストンにより実質的に圧縮する。液体の可能な出口は、ピストンに、もしくはマトリックスを含有する容器内に、もしくは溶離容器内に、またはこれらの構成要素のあいだに備えられる。

【0024】後述の容器を設計するのに使用される材料は、射出成形手順で、たとえばポリスチレン、とくに好ましくはポリプロピレンなどのプラスチック類にさらに適宜適切な添加剤類をとまって製造されるうるものが好ましい。

【0025】図1は、その下部に圧縮可能な多孔性マトリックスを含有する容器として形成された構造体Cである（縦方向断面図）。

【0026】図2は、マトリックスが圧縮される本発明のシステムである（縦方向断面図）。

【0027】図3は、マトリックスを圧縮し溶離液を受ける本発明におけるピストンである（縦方向断面図）。

【0028】図4は、圧縮可能な多孔性マトリックスを加圧するのに有利に適している溶離容器Dを示す（縦方向断面図）。

【0029】図5～6は、本発明によってバイオロジカル・マテリアルを単離するための方法に含まれる操作段階および構造の略図表現である。

【0030】図7～8はそれぞれ本発明の方法に用いられる試料容器および蓋の断面説明図である。

【0031】なお、図7において、A10は入口開口、A11は出口開口、A17は内側輪郭、A18はエラスチックな管、A19は外側輪郭、A20はバー、A21は保持要素、A22は位置決め要素である。

【0032】また、図8において、B10は閉塞要素、B11およびB12は操作要素、B13は通気路、B14はフィルター要素、B16は封入要素、B17はカバー部分である。

【0033】以下の説明は、より詳しく図面にあげられた対象物をさらに例示するものである。

【0034】図1は、本質的に上部および下部開口を有する中空シリンダーの形態を有する構造体Cの縦方向断面図である。下部において圧縮可能な多孔性マトリックスC11が管の横断面を先細にすることによって適所に固定されている。マトリックスは、底に向かってエッジC19によって、頂部に向かって円周状離脱バーC18によって、保持されている。構造体の内壁C16に沿って所望の離脱点を備えることによってこのバーをマトリックスC11に向かう方向に分離可能にし移行させる。構造体Cは、中空体C14として形成される外側輪郭C12および内部をも有する。さらに、この構造体はピストンEを構造体中に固定するための手段C17を備える。この手段は、ピストンがマトリックスC11を圧縮する位置に固定されるように形成されるのが好ましい。さらに、構造体Cは上部開口上の蓋を固定するための手段C15を具備するのが好ましい。さらに、溶離容器D中の構造体を固定するための手段C13を備えることも可能である。

【0035】図2は、本発明によるとくに好ましいシステムである。これは以下の構成要素、すなわち溶離容器

D、構造体C、ピストンEおよび蓋Bからなる。蓋Bはそれが全ての容器をカバーするように形成される。図2は、マトリックス中に本来含有される溶離液が前記マトリックスの外へピストンの内側E12中に、押し出される形態であるシステムを示す。

【0036】図3は、多孔性マトリックスを圧縮するためのとくに好ましいピストンEである。このピストンは構造体Cと溶離容器Dのあいだの空間をシールする下部の封止リングE15によって特徴づけられ、それによっていかなる溶液もそのように発生する毛管状のすき間に入るのを避ける。その上部領域で、ピストンEが構造体Cの嵌着ノッチC17中に導入されたばあいに、ピストンEは、構造体上のピストンを非可逆的に固定する嵌入リングをも有する。そのように固定されたピストンDは、前記のマトリックスの外に液体を押し出すためにマトリックスに十分な圧力を加える。

【0037】マトリックスに加えられる圧力は、ピストンEの嵌入連結の長さおよび構造体C中の嵌着ノッチの位置によって特定の範囲に調節される。ピストンEの下部形状は、その形態に合致した形状の接触面E10がマトリックスの妥当な圧縮を確実にするのに適している加圧ピストンを示す。ピストンの形態は、死容積が最小限になるように形成される。凹所E17は離脱バーC18の受け部（receptacle）として作用する。

【0038】マトリックスの外に押し出された溶液をえて収集するために、ピストンの下部には横断するシリンダー状通孔（bore）が備えられる。前記通孔は押し出された核酸含有溶液を受けるが、ピペットによって液体の除去するのにも適切な比較的小さな直径と高さを有する。図3は、通孔E18がピストンの可能な内容積に関して比較的狭い形成を呈している。通孔E18の一方の側は、接触面における開口E13で終わり、もう一方の側はピストンの内部E12で終わる。

【0039】ピストンの上部領域は、えられたバイオロジカル・マテリアルの溶液のための受け部として役立つ横断通孔でもある。下部と比較して、それは比較的大きな直径および適当な高さをもつ。直径および高さはそれらが内部E12の中にピペットを入れ、さらに通孔E18を介して内部に入った液体を取り出すのに適切であるように選択される。

【0040】図4は、好ましい溶離容器Dの縦方向断面図である。これは液体および／またはほかの機能性単位を溶離容器内に導入するための入口開口D10を有する。さらに、それは蓋Bを取り付けるために内部エッジD11を有する。嵌着ノッチD12も溶離容器の上部に備えられる。前記嵌着ノッチは手段C13により構造体の位置決めをするのに役立つ。別の好ましい特徴は、適切な直径の間隙が形成されたプレートに溶離容器D13を取り付けるための手段である。とくに好ましい特徴は、溶離容器の下部の接触面D14でもある。この表面

を構造体の下部と合致させることによって、容器の内側の死容積を減少させることが可能である。このことは、バイオロジカル・マテリアルのとくに効果的な回収につながる。

【0041】核酸含有試料溶液を処理する本発明の方法の特定の実施態様では、以下の操作段階が行なわれる

(図5~6参照)。第1の段階(I)では、核酸をうるために細胞が結合している材料とともに細胞含有試料液を試料容器A中でインキュベートする。これを達成するために、たとえば抗原の表面に抗体をまたは吸収材料

(A16、図示せず)を固定化することによって、前記材料はいずれかの細胞の表面の特異的結合特性を示しうる。しかし、液体が材料中を通過するばあい、たとえば試料容器から除去するばあいに細胞を残す濾過特性を有する材料(A15、図示せず)を備えることも可能である。表面上に細胞を固定化するための条件は当業者には、たとえばテネシー州、ナッシュビルに住所を有するバンダービルトユニバーシティー(Vanderbilt University)の分子生物学部のシドニー・フレイシャー(Sidney Fleischer)、ベッカ・フレイシャー(Becca Fleischer)によって編集された、メソズ・イン・エンザイモロジー(Methods in Enzymology)、171巻、バイオメンブランズ/パート・アール・トランスポート・セオリー(Biomembranes/Part R Transport Theory);セル・アンド・モデル・メンブランズ(Cell and Model Membranes)により知られている。

【0042】インキュベーション中、蓋(B)は汚染からの積極的および消極的の保護を確実にするために試料容器を閉じるのが好ましい。

【0043】別の段階では、試料容器から液体が除かれるが、その核酸が単離されるべきである細胞はそれらが材料に結合している容器に残る。細胞と結合する材料が粒子型材料であるばあい、材料が電磁性であり、さらに磁界が外側から試料容器に適用されている点で、細胞は残されうる。前記磁界は、液体が除かれるときに試料容器中の粒子型材料を残すほど十分に強くなければならない。液体は異なる方法で除かれうる。たとえば、入口開口A10から空間的に離れた出口開口A11を通過して液体を除くことができる。もし前記出口開口が試料容器の下部に、そして残された細胞より下に位置すれば、液体はたとえば低い真空を適用することにより液体が吸引しうる。これを達成するために、そのような低い圧力を発生するバルブを出口開口に備えていてもよい。

【0044】細胞からほかの妨害となりうる試料成分を取り除くために、1または数回の洗浄段階を行なうことも可能である。これを達成するために、洗浄液を試料容器に充填する。前記洗浄液は細胞結合材料の表面への細胞の結合には本質的に影響を与えないが可能な限り汚染物を溶解する。このような洗浄液は、たとえば核酸のための細胞分離プロトコルまたは対応する洗浄キットブ

ロトコルから当業者に知られている。それらは、どのように細胞が材料に結合するかに基本的に依存する。

【0045】最後の洗浄液が試料容器Aから除去されたのち、精製され濃縮された細胞を、細胞から核酸を放出するために適切な溶解液と接触させる。この溶解液の試薬は固定化された細胞のタイプにおおいに依存する。細胞が細菌であるばあい、溶解液は細胞壁を消化するプロテイナーゼKを含有するのが好ましい。適宜、溶解は反応混合物を加熱または冷却および攪拌することによって補助されることが可能である。電磁性粒子が細胞結合材料として使用されると、磁石により混合が達成される。さらに、試料容器を振とうすることにより溶液を混合することも可能である。いったん消化が完了すると、単離されるべき核酸は溶液のかたちで自由に入手しうる。

【0046】溶解のあいだでさえ、周囲からの汚染を避けるために反応容器を蓋で閉じるのが好ましい。溶解の完了ののち、望ましくは対応する機械的デバイスを用いて蓋を取り除く。つぎに、その外側輪郭C12が試料容器の内側輪郭A17に合致する構造体Cを、細胞の消化生成物と核酸との混合物を含有する試料容器内に導入する。この構造体は、中空で、試料容器について、そして反応混合液についてフィルターによってシールされている。試料容器を閉じるのに適切な構成要素B10をも含む蓋Bの構成要素B11により構造体Cを導入すると好ましく達成される。このばあいに、蓋を閉じたままで蓋により構造体を取り上げ(II)、試料容器中に導入する。この手順のあいだじゅう、反応混合物は、フィルターC11を横切って構造体の中空体C14に入りうる

(IV)。フィルターを備えることで、大きな粒子が中空空間に入り込むのを防ぐことが可能である。フィルターが核酸結合特性をすでにもっていれば、反応混合物が通過するあいだ、核酸はすでにフィルターに結合することができる。このばあい、フィルター材を含有するガラス繊維を選択することが好都合である。

【0047】つぎの段階では、たとえば容器の下部に位置する出口開口A11を通じて試料容器から溶液を吸引することにより、残る溶解反応混合物をAおよびCからなるデバイスから取り除く。それによって、構造体の中空体C14に入っていた溶液も取り除かれて、フィルターはもはや液体をほとんど含有しない。つぎに、構造体Cを依然としてまだ試料容器内に残しておく(所定の位置に嵌入させている)一方で、ここまで使用した蓋Bを取り除く(V)。

【0048】同時にまたは続いて、構造体Cを受けるために溶離容器Dを製造する。必要であれば、この容器に備えうる蓋を取り去る(VI)。好ましくは、構造体Cを溶離容器Dに移す前に溶離容器中に、たとえばビペットで溶離液を供給する。溶離液の組成は、フィルターC中で、どのように核酸が材料に結合しているかに

左右される。それは、固定化された核酸を材料から溶離させる、すなわち、そこから放出させる試薬を含有する。当初溶離容器を閉じるために使用した蓋Bをここで構造体Cをともなった試料容器Aの上に載せる(VI I)。

【0049】試料容器Aの外に構造体Cを取り出すために、まず蓋を取り除く。つぎに、蓋と構造体との結合体を溶離容器内に導入する。好ましい方法では、構造体Cは、構造体を溶離容器D中の適所に固定するための手段C13Kを含む。前記の手段のゆえに、前記構造体を取り除くために構造体Cまたは容器Dを破壊しなければならないか、または構造体Cから蓋Bを取り除くのに必要な力を越える力を適用しなければならない。本発明は溶離容器から構造体を取り外すことを提案するものではない。

【0050】構造体Cが溶離容器に入る一方で、すでに供給されている溶離液はマトリックスC11に入って固形マトリックスから固定化された核酸を放出する。調製された溶離液の量によって、フィルターの上に溶離液をしみ込ませるか、または溶離液が放出された核酸とともに中空体C14に入る。核酸の溶離を完了するために、溶離容器の内側輪郭を構造体の外側輪郭に対して可能な限りしっかりと付勢されるように決めるべきである。

【0051】続く段階では、構造体Cおよび溶離容器Dの結合体から蓋Bを取り除く(X)。前記蓋Bを使用してピストンEを取り上げ(XI)、さらに構造体Cの中空体中に前記ピストンEを導入する(XII)。前記蓋を、内側でピストンEと係合させる。フィルターに存在する液体が、ピストンの内部へ接触面に配置された開口を通過するようなフィルターC11に対してピストンが押される。接触面の外側輪郭が、前記の押すことが達成される領域で少なくとも構造体Cの内側輪郭と合致するばあい、この手順はとくに効果的である。たとえば正しい位置に嵌入することによって、この位置にピストンEを固定するのが好ましい。蓋によってそのように形成されたデバイスが比較的良好にシールされているので、核酸含有溶液はそのデバイス内に貯蔵される。

【0052】所望量の核酸溶液を取り出すために、蓋は取り除きうるもので(XIII)、さらにたとえばピベッティングによって、ピストンの内部における開口を介して所望量を取り出しうる(XIV)。つぎに蓋は正しい位置に戻しうる。

【0053】

【発明の実施の形態】本発明の方法は好ましくは以下の工程：

- a) 圧縮可能なマトリックスC11にバイオロジカル・マテリアルを結合させること、
- b) 溶離容器D内に溶離液を加えること、
- c) 圧縮可能な多孔性マトリックスC11をとくに好ましくは構造体C内に導入すること、

d) ピストンEを構造体Cおよび溶離容器D中に導入すること；前記ピストンは、マトリックスを圧縮するのに適した接触面を有し；ピストンは、マトリックスの外に押し出された液体を受ける内部E12を有する、およびe) ピストンを構造体に係合させることで、マトリックスが圧縮状態を保つことからなる。所望により、工程bおよびcの順序はこの手順において交換してもよい。内部に入っているバイオロジカル・マテリアルとともに含む溶離液は、このシステムでつづけて貯蔵しうる（閉じられた蓋を有するのが好ましい）。またはピベットを用いて取り出し、いかなる所望の方法で処理しうる。

【0054】本発明の方法は、比較的高い濃度でバイオロジカル・マテリアルの溶液を生成するのにとくに適している。本発明は、マトリックスから核酸を生成させ、一方エアロゾルの発生を減少させる。さらに、本発明で提案されたような操作段階は処理の自動化およびバイオロジカル・マテリアルを単離する方法をおおいに促進する。

【0055】本発明の別の主題は、以下の構成要素；溶離容器D、圧縮可能な多孔性マトリックス、およびマトリックスを圧縮するためのピストンEからなるバイオロジカル・マテリアルを単離するためのシステムである。

【0056】さらに好ましい特徴は、本発明の方法に記載される。以下の実施例は本発明をより詳細に説明する。しかしながら、本発明の実施例はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0057】実施例1

ピストンの好ましい具体例は、異なる直径をその内部にもつ中空円筒状のプラスチック管Eである(D〔底部〕=1mm、D〔頂部〕=5mm)。

【0058】ピストンは、以下に示す寸法によって特徴づけられうる。

【0059】長さ：38.6mm

外径：5.8mm

内径：5.0mm

ピストンの下部は中央孔ないし中央開口E13を備える。頂部は、頂部に向かって開く受け部E12である。

【0060】この頂部で、外側表面Eは構造体Cを被覆して位置決めする嵌着リングE16を有する。円周状の嵌着リングは、上部エッジより3.5mm下に配置され、深さ0.3mmおよび高さ0.25mmを有する。その下部に、構造体Cについてピストンをシールする封止口E15がピストンに備わっている。前記封止口は0.28mmまで上昇し、0.1mmの幅がある。

【0061】ピストンの上部開口は、溶離容器Dに機能的蓋Bを繋げる内側の形状を有する。ピストンEは、構造体Cに導入することができ、蓋Bといっしょになって全体のシステムを閉じるように形成される。

【0062】実施例2

50 バイオロジカル・マテリアル／薬品／デバイス

試料マテリアル：ロンギチューディナル スタンダード II (Longitudinal Standard II)、ベーリンガー・マンハイム社製

結合緩衝液：キアゲン (Qiagen) AL 1 / AL 2 (4部 / 1部)、キアゲン社製。

【0063】

洗浄緩衝液：キアゲン AW 緩衝液、キアゲン社製。

【0064】

溶離緩衝液：10 mM トリス 緩衝液、pH 9.0

試料容器 A

試料容器の蓋 B

ガラス製フリースから作られた多孔性マトリックス C 11 を有する構造体 C

溶離容器 D

溶離容器の蓋 E

構造体の加圧ピストン F

〔試料液の調製〕

試料 200 μ l (PBS 緩衝液に溶解した 6 μ l のロンギチューディナル スタンダード II プロテイナーゼ K 25 μ l
結合緩衝液 200 μ l (4 + 1 の比率で混合された AL 1 および AL 2 緩衝液
エタノール 210 μ l
総量 —
各バッチ 635 μ l

〔実施例が行なわれる方法〕試料容器 A を、200 μ l の試料、25 μ l のプロテイナーゼ K 溶液および 200 μ l の結合緩衝液で充填した。試料容器 A を試料容器の蓋 B で閉じた。閉じた容器内で液体を混合した。つぎに、混合物を 70℃ で 10 分間インキュベートし (細胞 30 の消化)、つぎに冷却相によって 3 分間で 20℃ まで冷却した。試料容器 A を開き、そして 210 μ l のエタノールを加えた。試料容器 A を閉じて、さらに溶液を混合

表 1

試験番号	単離された結合核酸 (μ g)	収 率 (%)
試験 1	1.4	22.9
試験 2	1.6	27.5
試験 3	1.2	23.8
試験 4	1.5	29.8
試験 5	1.6	35.2

【0071】

した。

【0065】試料容器 A を開いた。試料容器の蓋 B を使用して、その支持体の外から多孔性マトリックスを有する構造体 C をえた。ガラス製フリース・マトリックスを伴う構造体を、入口開口を通して液体で充填した試料容器に導入した。導入のあいだ、試料容器 A 中に存在する液体は底部からガラス製フリースを通過した。ここで、自由に移動する核酸は、ガラス製フリース・マトリックスと結合した。つぎの段階で、構造体 C 中に存在する液体は、底部に向かって吸引した。再度液体はガラス製フリースを通過し、そこで、まだ結合していない核酸がマトリックス上に固定化された。

【0066】ガラス製フリース・マトリックスを 2 回 500 μ l の洗浄緩衝液を用いて洗浄した。マトリックス上の緩衝液はガラス製フリースを通して吸引した。つぎに、マトリックスを 50℃ で 3 分間精製された核酸とともに乾燥させた。試料容器の蓋 B を取り除いた。

【0067】溶離容器の蓋 E を使用して、核酸を含有する構造体 C を試料容器 D から、その中に 200 μ l 溶離緩衝液をともなった調製した溶離緩衝液中に移した。溶離緩衝液はガラス製フリースから核酸を放出した。核酸はマトリックスの上に部分的に配置された。

【0068】加圧ピストン F を溶離容器の蓋 E により導入することによって、核酸溶液の死容積を最小にするために、構造体中のマトリックスを圧縮した。

【0069】〔核酸生成〕2 つの異なる核酸試料濃度を用いて試験を行なった。以下に示す結果を測定することができた。表 1 には 200 μ l の溶離液中核酸 6 μ g を含有する試料濃度を用いて行なった試験の結果を示す。表 2 には 200 μ l の溶離液中核酸 20 μ g を含有する試料濃度を用いて行なった試験の結果を示す。

【0070】

〔表 1〕

〔表 2〕

表 2

試験番号	単離された結合核酸 (μg)	収 率 (%)
試験 1	3.7	28.0
試験 2	6.4	38.8
試験 3	4.8	40.0
試験 4	4.1	30.3
試験 5	5.1	37.8

【図面の簡単な説明】

【図 1】 その下部に圧縮可能な多孔性マトリックスを含む容器として形成された、本発明の方法に用いられる構造体の縦方向断面図である。

【図 2】 マトリックスが圧縮される本発明のシステムの縦方向断面図である。

【図 3】 マトリックスを圧縮し溶離液を受ける本発明におけるピストンの縦方向断面図である。

【図 4】 圧縮可能な多孔性マトリックスを加圧するのに有利に適している溶離容器の縦方向断面図である。

【図 5】 本発明によってバイオロジカル・マテリアルを単離するための方法に含まれる操作段階および構造の概略説明図である。

【図 6】 本発明によってバイオロジカル・マテリアルを単離するための方法に含まれる操作段階および構造の概略説明図である。

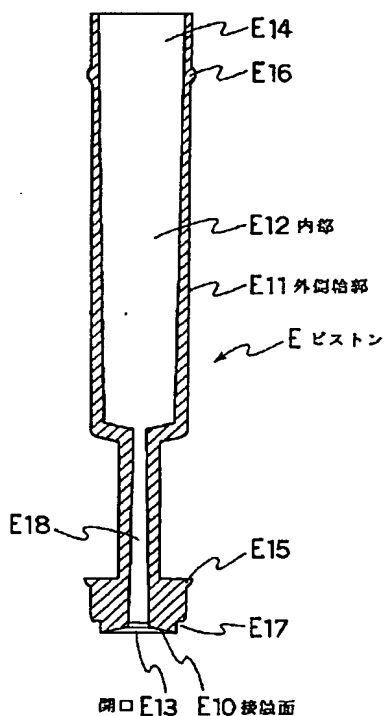
【図 7】 本発明の方法に用いられる試料容器の断面説明図である。

【図 8】 本発明の方法に用いられる蓋の断面説明図である。

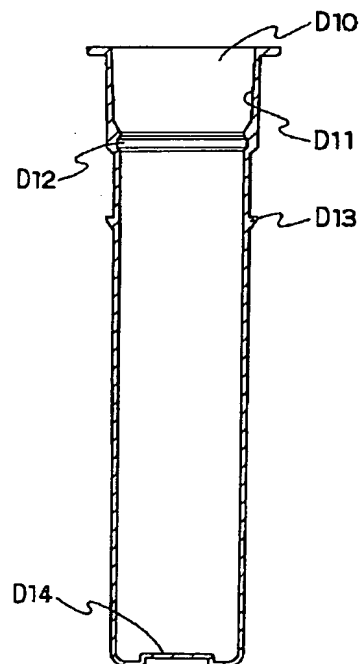
【符号の説明】

- A 試料容器
- B 蓋
- C 構造体
- 1 1 多孔性マトリックス
- 1 2 外側輪郭
- D 容器
- E ピストン
- 1 0 接触面
- 1 1 外側輪郭
- 1 2 内部
- 1 3 開口

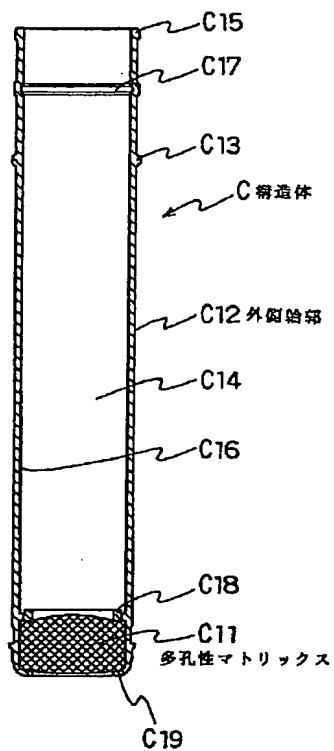
【図 3】



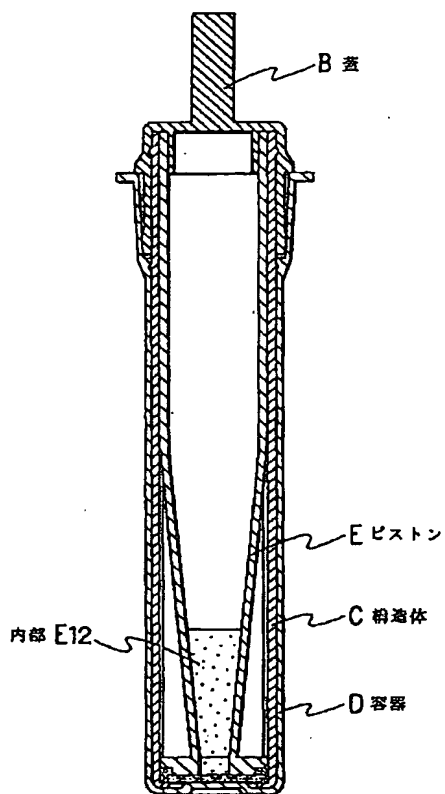
【図 4】



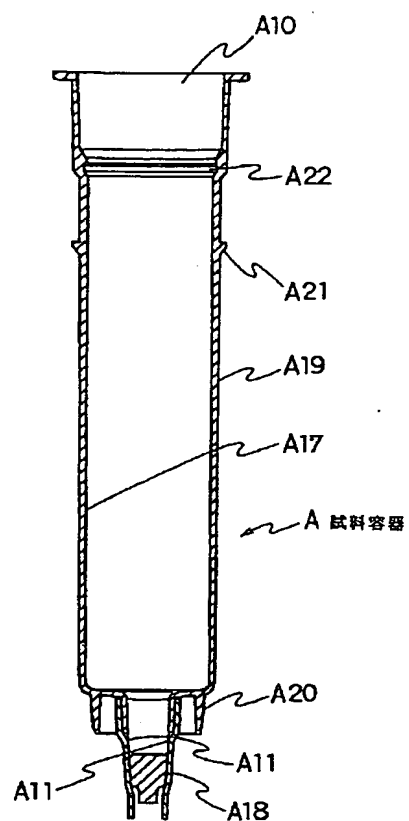
【図 1】



【図 2】



【図 7】



【図 5】

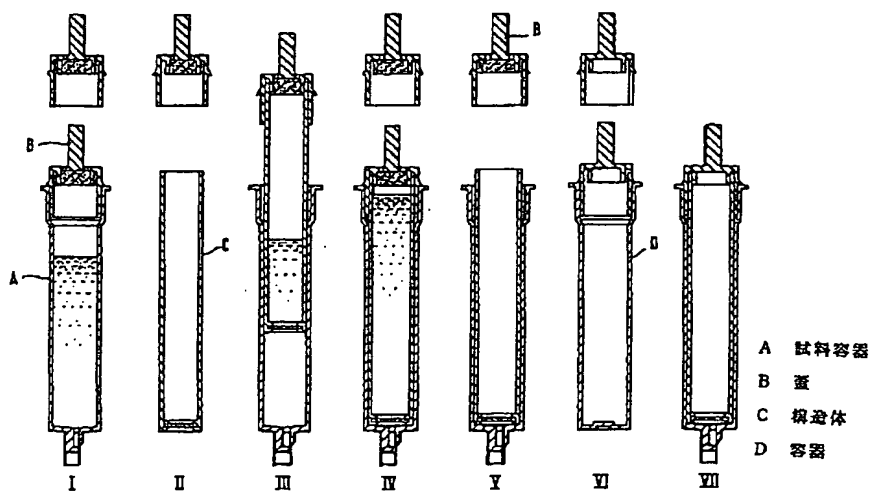


Figure 1 shows schematic diagrams of various types of test cells (VIII-XIV) used for studying the properties of materials under pressure. The diagrams illustrate different internal structures and components within the cells. A legend on the right identifies the components:

- A: 試料容器 (Sample container)
- C: 構成員 (Component)
- D: 容器 (Container)
- E: ピストン (Piston)

Figure 1 is a cross-sectional view of a sample container assembly. The assembly includes a sample container (A) with a sample (B) inside. The container has a top flange (B10) and a bottom flange (B16). The sample is held in place by a central rod (B12) with a conical top (B13) and a base (B17). The container is surrounded by a support structure (C) with an outer profile (C12) and a base (C16). The sample is labeled B, and the container is labeled A.

b) バイオロジカル・マテリアルを前記マトリックスの表面から溶離液に放出させる条件下で前記マトリックス

を圧縮する工程からなるバイオロジカル・マテリアルを単離する方法。

【請求項 2】 マトリックス (C 1 1) が、溶離液をピストンの内部に通過させるための 1 ないし数個の開口 (E 1 3) を接触面に有するピストン (E) により、圧縮されることを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】 マトリックス (C 1 1) が圧縮されるとき、直接または間接的に嵌入連結で溶離容器 (D) に取

り付けうるピストン (E) により、マトリックス (C 1 1) を溶離容器中で圧縮することを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】 以下の構成部分、溶離容器 (D) 圧縮可能な多孔性マトリックス (C 1 1) および前記マトリックスを圧縮するためのピストン (E) からなるバイオロジカル・マテリアルを単離するためのシステム。

フロントページの続き

(72)発明者 ゲルハルト ビーンハウス
ドイツ連邦共和国、デー-82407 ヴィー
レンバッハ、カーヴェンデルシュトラ
ーセ 1
(72)発明者 ミハエル フリッツ
ドイツ連邦共和国、デー-68647 ビーブ
リス、グロス-ロールハイマー-シュトラ
ーセ 19
(72)発明者 ユルゲン シュヴァーブ
ドイツ連邦共和国、デー-68775 ケッチ、
エンデルシュトラーセ 37

(72)発明者 エダ ガイスラー
ドイツ連邦共和国、デー-68199 マンハ
イム、フリードリッヒシュトラーセ 141
(72)発明者 ヘルベルト ハルティヒ
ドイツ連邦共和国、デー-67122 アルト
リップ、フォイエルバッハシュトラーセ
11
(72)発明者 ハインツ マーホ
ドイツ連邦共和国、デー-64658 ヒュル
ツ、オルツシュトラーセ 42

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ ~~FADED~~ TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.